

## Imunitná odpoveď v malígnom melanóme – výsledky pilotnej štúdie

Jana Lacová<sup>1</sup>, Andrea Janegová<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Ústav patologickej anatómie, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave

<sup>2</sup>Patologicko-anatomické oddelenie, Fakultná nemocnica v Trnave

Malígný melanóm predstavuje nádor s výraznou heterogenitou nádorových buniek, určujúcich jeho agresívne správanie. Akumulácia mutácií však vedie aj k vzniku neoantigénov, proteínov, ktoré sú schopné vyvolať protinádorovú imunitnú odpoveď u pacienta. Cieľom predloženej pilotnej štúdie bolo posúdiť aktiváciu protinádorovej imunity v rôznych typoch melanocytových lézií kože, zahŕňajúc prípady benígnych komplexných névov, dysplastických névov a povrchovo sa šíriaceho malígneho melanómu aj pokročilého nodulárneho malígneho melanómu. Zamerali sme sa na prítomnosť cytotoxických T-lymfocytov a NK buniek, ktoré sú považované za kľúčové efektorové bunky protinádorovej imunity. V porovnaní s benígnym melanocytovým névom sme v ostatných melanocytových léziách zaznamenali výraznejšiu protinádorovú zápalovú odpoveď charakteristickú vzostupom infiltrácie tkaniva lymfocytmi s predominciou cytotoxických T-lymfocytov. Výrazný vzostup peritumorálne aj intratumorálne prítomných cytotoxických T-lymfocytov sme pozorovali už v dysplastických névoch aj v prípadoch superficiálne sa šíriaceho malígneho melanómu. V prípadoch pokročilého nodulárneho malígneho melanómu bol vzostup peritumorálnych lymfocytov na hranici signifikantnosti, kým intratumorálne lymfocyty signifikantne zvýšené neboli. Imunitná odpoveď zohráva úlohu v procese progresie malígneho melanómu. Pochopenie regulácie imunitnej odpovede môže byť kľúčové v terapii malígneho melanómu v budúcnosti.

**Kľúčové slová:** malígný melanóm, protinádorová imunita, cytotoxické T-lymfocyty, NK bunky

### *Immune response in malignant melanoma – results of the pilot study*

Malignant melanoma is a tumour with marked heterogeneity of tumour cells, determining its aggressive behaviour. Accumulation of mutations, however, leads to the formation of neoantigens, proteins that are capable of eliciting an antitumour immune response in patients. The objective of the presented pilot study was to assess the activation of antitumor immunity in various types of skin melanocytic lesions, including cases of benign complex nevi, dysplastic nevi and superficial spreading malignant melanoma as well as advanced nodular malignant melanoma. We have focused on the presence of cytotoxic T-lymphocytes and NK cells, which are key effector cells of antitumour immunity. Compared to benign melanocytic nevi, we have seen a more pronounced anticancer inflammatory response in other melanocytic lesions, characterized by increased tissue infiltration by lymphocytes with predominance of cytotoxic T-lymphocytes. A significant increase in both peritumoural and intratumoural cytotoxic T-lymphocytes was observed in dysplastic nevi as well as cases of superficial spreading malignant melanoma. In cases of advanced nodular malignant melanoma, the increase was at the significance limits; intratumoural lymphocytes were not increased. Immune response plays a role in the process of malignant melanoma progression. Understanding the regulation of immune response may be a key point in the therapy of malignant melanoma in the future.

**Keywords:** malignant melanoma, antitumor immune response, cytotoxic T-lymphocytes, NK cells

NewsLab, 2019; roč. 10 (1): 20 – 24

### Úvod

Po kardiovaskulárnych ochoreniach sú onkologické ochorenia druhou najčastejšou príčinou smrti. Hoci sa malígný melanóm nenachádza na popredných priečkach najčastejšie sa vyskytujúcich nádorov, neskorá diagnostika tohto nádoru vedie k zlej prognóze pacienta. Jeho prognóza výrazne závisí od štádia, v ktorom je melanóm diagnostikovaný, preto je veľmi dôležitý jeho včasný záchyt. Na Slovensku v súčasnosti neexistuje spoľahlivý skriningový program podozrivých kožných lézií. Diagnostika je často závislá od všímavosti pacientov, ich rodinných príslušníkov, prípadne všeobecných lekárov. Samovyšetrenie, poznanie vlastných névov, je kľúčové. Vznik malígneho melanómu je sprevádzaný zmenami tvaru, okrajov, farby aj rastového vzoru kožnej pigmentovej lézie.

Každé takéto podozrivé ložisko by mal vyšetriť dermatovenerológ a v prípade potreby nálež histologizovať a definitívnu diagnózu by mal potvrdiť patológ. Pri včasných štádiách postačí chirurgická excízia, v prípade zachytenia v neskoršom štádiu, najmä pri prítomnosti vzdialených metastáz, sa už k liečbe pripája aj systémová terapia, prípadne biologická terapia.

Rizikový faktor vzniku tohto typu nádoru predstavuje hlavne ultrafialové žiarenie. Je dokázané, že hlavne intermitentné vystavenie kože slnku a spálenie, sú predispozičnými faktormi vzniku melanómu. K ďalším etiologickým faktorom patrí typ kože, genetické vplyvy, vek a počet névov. Závažná je stúpajúca incidencia tohto tumoru v celej vyspelej Európe. Uvádza sa, že jeho výskyt sa v posledných 30 rokoch

strojnásobil, alarmujúci je aj štvornásobný vzostup mortality za toto obdobie<sup>(1)</sup>.

Malígny melanóm predstavuje nádor s výraznou heterogenitou nádorových buniek, charakteristickú akumuláciou početných mutácií. Aj keď na jednej strane výrazná genetická variabilita malígneho melanómu predurčuje jeho agresívne správanie vzhľadom na vznik nových vlastností a schopnosť vráťane rezistencie na podávanú terapiu, na druhej strane táto výrazná genetická variabilita vedie k vzniku neoantigénov, proteínov, ktoré nie sú vlastné samotnému organizmu a ktoré môžu aktivovať jeho imunitný systém. Protinádorová imunita je v súčasnosti intenzívne študovaná a predstavuje zaujímavú oblasť na identifikáciu nových terapeutických cieľov<sup>(2)</sup>. Lieky zasahujúce do aktivácie protinádorovej imunity sa v posledných rokoch stali súčasťou štandardnej liečby pokročilého malígneho melanómu<sup>(3)</sup>. Experimentálne je testovaná aj protinádorová vakcinácia, ktorá môže v budúcnosti zmeniť priebeh choroby a prognózu postihnutých pacientov<sup>(4)</sup>.

Cieľom predloženej práce bolo posúdiť aktiváciu protinádorovej imunity v rôznych typoch melanocytových lézií kože, zahŕňajúc prípady bežných névov, dysplastických névov a malígneho melanómu. Zamerali sme sa na prítomnosť cytotoxických T-lymfocytov a NK buniek, ktoré sú považované za kľúčové efektorové bunky protinádorovej imunity.

## Metodika

Základný súbor pilotnej štúdie tvorilo 17 pacientov s melanocytovými léziami kože, ktorým bolo realizované bioptické vyšetrenie a stanovená histopatologická diagnóza. Vyšetrený materiál tvorili archívne prípady vzoriek fixovaných formalínom a zaliatych v parafíne (FFPE). Získaný materiál pochádzal z archívu Ústavu patologickej anatómie Lekárskej fakulty Univerzity Komenského a Univerzitnej nemocnice v Bratislave z rokov 2015 – 2017.

Pacienti boli rozdelení do štyroch skupín:

- pacienti s benígnymi komplexnými (zmiešanými) névami (5 pacientov)
- pacienti s dysplastickými (Clakovými) névami (4 pacienti)
- pacienti so superficiálne sa šíriacim melanómom (SSM) (4 pacienti)
- pacienti s pokročilým nodulárnym malígnym melanómom s prítomnými vzdialenými metastázami (NMM) (4 pacienti)

Dostupné vzorky boli štandardne histopatologicky spracované a farbené hematoxylínom a eozínom s následným histopatologickým hodnotením podľa aktuálne publikovaných WHO štandardov.

Vzorky boli následne imunohistochemicky zafarbené na prítomnosť CD8 + cytotoxických T-lymfocytov a CD56 + NK buniek; odparafínované rezy boli krátko inkubované v destilovanej vode s 0,5 % roztokom peroxidu vodíka. Následne sme vzorky preniesli do PBS (fyziologického roztoku puľovaného fosfátmi 10 mM, s 0,5 % BSA, 0,005 % Tween, pH 7,2), kde boli inkubované 20 minút. Vzorky boli revitalizované vo vodnom kúpeli s použitím Dako PT Link (Agilent, Santa Clara, California) pri pH 8 a následne inkubované počas 1 hodiny pri laboratórnej teplote s roztokmi primárnych protilátok

riedených v roztoku Antibody dilutant (Agilent, Santa Clara, California). Použité boli nasledujúce primárne protilátky: anti-CD8 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX) ready to use, riedená 1 : 2 a anti-CD56 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX) ready to use, riedená 1 : 2. Po prepláchnutí 3x 5 minút vo fyziologickom roztoku PBS boli následne rezy inkubované 40 minút s komerčným polymérom proti králičím a myšacím proteínom konjugovaným s chrenovou peroxidázou Envision (Agilent, Santa Clara, California) a po opakovanom prepláchnutí 3x 5 minút vo fyziologickom roztoku PBS bola reakcia vyvolaná inkubáciou s Vector-VIP (Vector Laboratories, Burlingame, USA) počas 5 minút. Preparáty boli následne krátko dofarbené hematoxylínom.

Expresia vybraných markerov bola hodnotená samostatne okolo nádorovej lézie (peritumorózne) a vnútri nádorovej lézie (intratumorózne) semikvantitatívne nasledovne:

- bunky neboli prítomné (DPS skóre 0)
- + bol prítomný slabý a nepravidelný infiltrát pozitívnymi bunkami (do 50 na zorné pole 400x) (DPS skóre 1)
- ++ bol prítomný pravidelný infiltrát pozitívnymi bunkami (50 – 100 na zorné pole 400x) (DPS skóre 2)
- +++ bol prítomný výrazný difúzný pravidelný infiltrát pozitívnymi bunkami (viac ako 100 na zorné pole 400x) (DPS skóre 3)

Údaje sme následne štatisticky spracovali. Miera infiltrácie tkaniva príslušným typom imunokompetentných buniek je vyjadrená ako priemer ± štandardná chyba merania. Normalita hodnôt bola overená použitím D'Agostino Pearson omnibus normality testu. Rozdiely medzi skupinami boli analyzované pomocou testu neparametrického Mannovho-Whitneyho testu. Hodnoty  $p < 0,05$  boli posudzované ako signifikantne významné.

## Výsledky

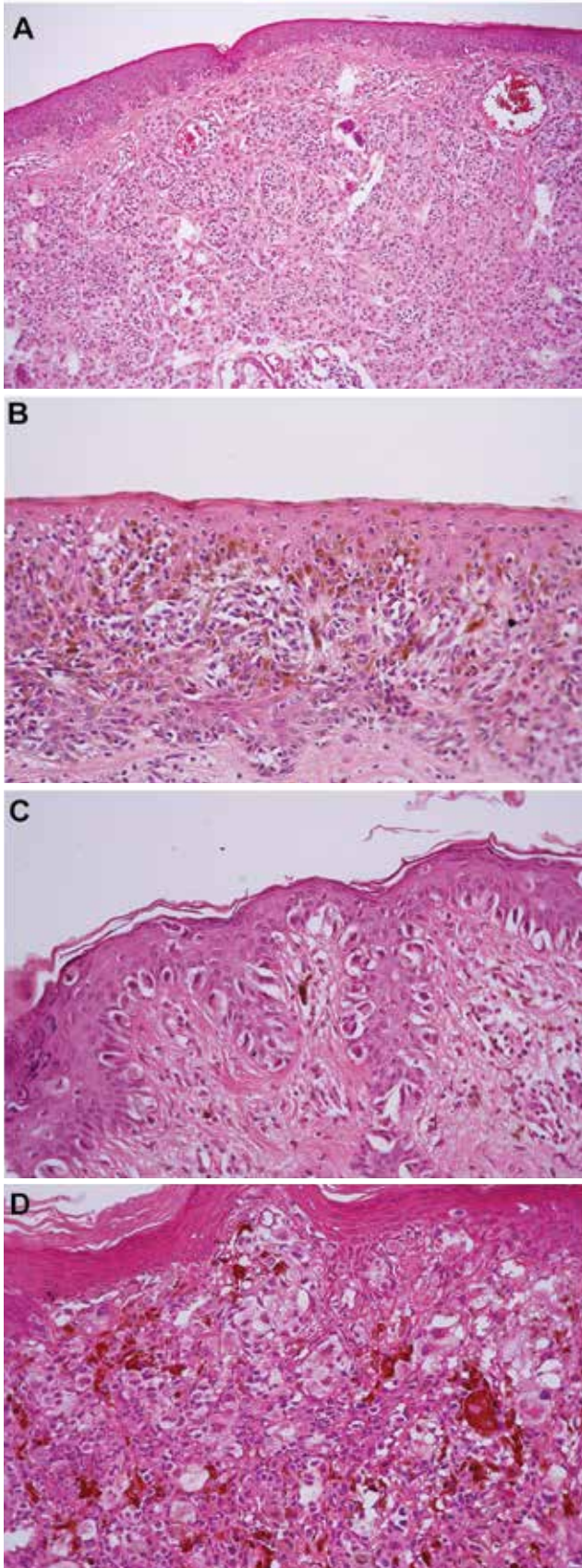
V prípadoch benígneho komplexného melanocytového névu sme pozorovali len slabú a nepravidelnú infiltráciu CD8+ cytotoxickými T-lymfocytmi v okolí lézie, v žiadnom prípade neboli zápalové bunky prítomné vnútri melanocytových hniezd. V 4 prípadoch sme nepozorovali žiadne CD56+ NK bunky peritumorózne ani intratumorózne, v 1 prípade bol prítomný slabý pravidelný infiltrát CD56+ NK bunkami peritumorózne.

V porovnaní s benígnym melanocytovým névom sme v prípadoch dysplastického névu aj malígneho melanómu zaznamenali výraznejšiu protinádorovú zápalovú odpoveď charakteristickú vzostupom infiltrácie tkaniva lymfocytmi (**obrázok 1**).

Pozorovali sme signifikantný vzostup intraléziivo aj periléziivo prítomných CD8 pozitívnych cytotoxických T-lymfocytov (**obrázok 2**) v dysplastickom néve (s hodnotou skóre  $2,25 \pm 0,48$ , resp.  $2 \pm 0,41$ ) aj v povrchovo sa šíriacom malígnom melanóme (s hodnotou skóre  $2,5 \pm 0,29$ ) v porovnaní s benígnym melanocytovým névom (s hodnotou skóre  $0,4 \pm 0,24$ , resp.  $1,75 \pm 0,75$ ). V prípadoch pokročilého nodulárneho malígneho melanómu bol tento vzostup v porovnaní s benígnym névom peritumorózne na hranici signifikantnosti (s hodnotou skóre  $2 \pm 0,41$ ), vzostup intratumorózných lymfocytov signifikantný nebol (**obrázok 3, 4**).

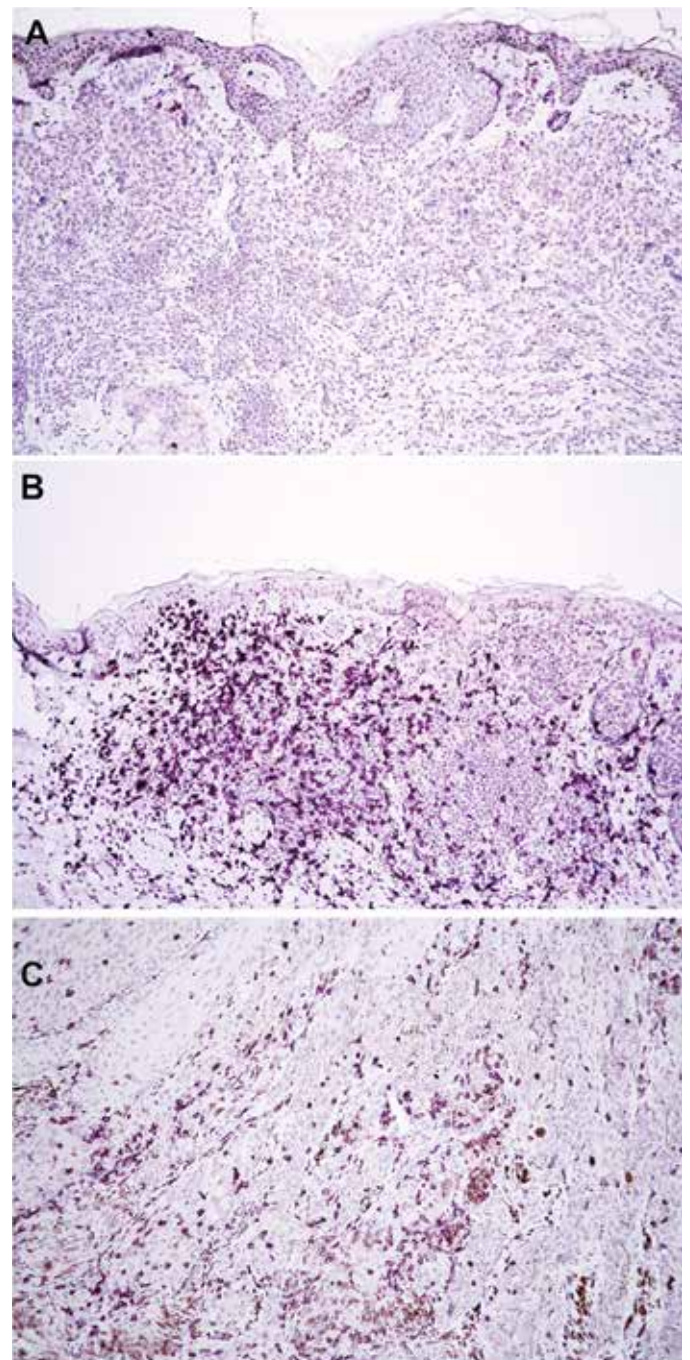


**Obrázok 1.** Protinádorová zápalová odpoveď v melanocytových léziách kože. V porovnaní s benígnym melanocytovým névom (A) sme v prípade dysplastického névu (B) aj superficiálneho malígneho melanómu (C) a pokročilého nodulárneho malígneho melanómu (D) zaznamenali výraznejšiu protinádorovú zápalovú odpoveď charakteristickú vzostupom infiltrácie tkaniva lymfocytmi.

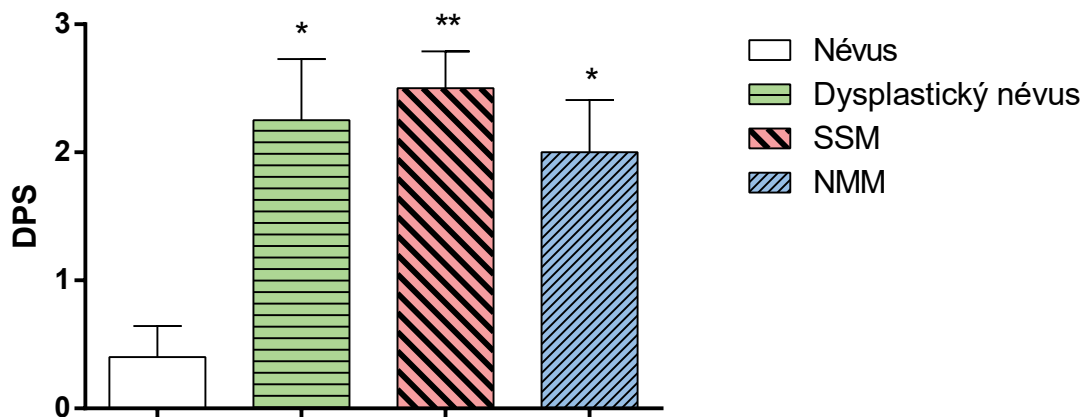


CD56+ NK bunky peritumorózne aj intratumorózne nevykazovali štatisticky signifikantný rozdiel medzi skupinami, len v prípade dysplastického névu sme pozorovali vzostup (s hodnotou  $1,25 \pm 0,4787$ ), ktorý bol v porovnaní s benígnym komplexným névom (s hodnotou  $0,4 \pm 0,4$ ) na hranici signifikantnosti. V prípadoch superficiálne sa šíriaceho melanómu (s hodnotou  $0,67 \pm 0,33$ ) a pokročilého nodulárneho melanómu (s hodnotou  $0,5 \pm 0,29$ ) sa infiltrácia NK bunkami neodlišovala od prípadov benígnych komplexných névov (obrázok 5).

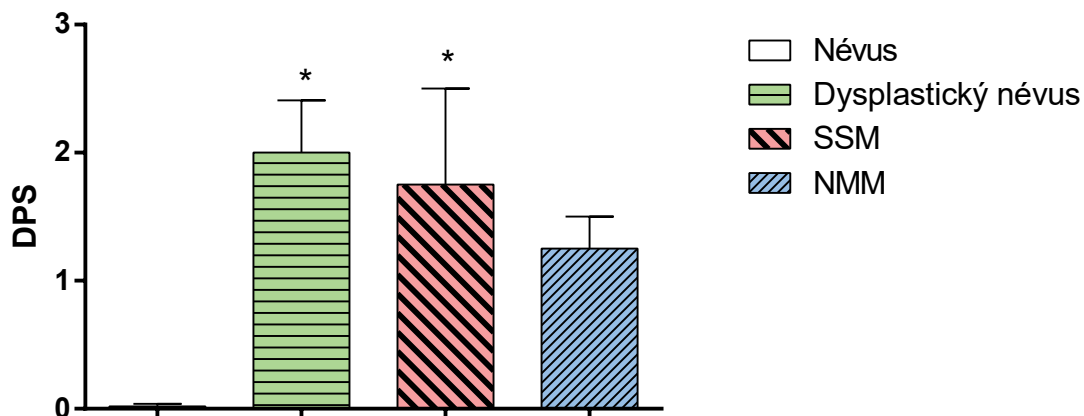
**Obrázok 2.** Infiltrácia tkaniva CD8+ cytotoxickými T-lymfocytmi. V benígnych névoch (A) sme pozorovali minimálnu alebo žiadnu infiltráciu tkaniva CD8+ cytotoxickými T-lymfocytmi. Tá výrazne stúpla v dysplastických névoch (B), menej výrazný vzostup sme pozorovali v prípade pokročilého nodulárneho malígneho melanómu (C). IHC-Px, CD8, Vector-VIP (fialová farba), 200x.



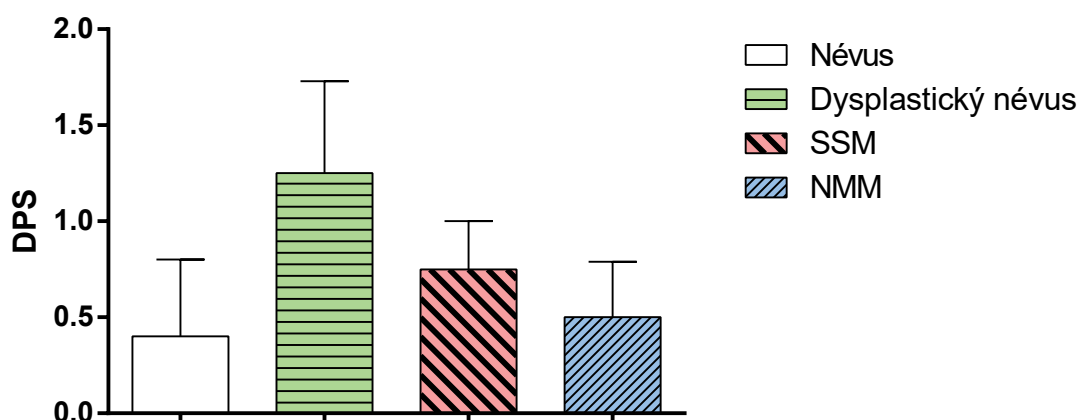
**Obrázok 3.** Infiltrácia tkaniva CD8+ cytotoxickými T-lymfocytmi okolo melanocytovej lézie. Pozorovali sme signifikantný vzostup CD8 pozitívnych cytotoxických T-lymfocytov v dysplastickom néve ako aj v povrchovo sa šíriacom a pokročilom nodulárnom malígnom melanóme v porovnaní s benígnym melanocytovým névom.



**Obrázok 4.** Infiltrácia tkaniva CD8+ cytotoxickými T-lymfocytmi vnútri melanocytovej lézie. Pozorovali sme signifikantný vzostup CD8 pozitívnych cytotoxických T-lymfocytov v dysplastickom néve aj v malígnom melanóme šíriacom sa povrchovo v porovnaní s benígnym melanocytovým névom. V pokročilom nodulárnom malígnom melanóme tento vzostup signifikantný nebol.



**Obrázok 5.** Infiltrácia tkaniva CD56+ NK bunkami. NK bunky nevykazovali štatisticky signifikantný rozdiel medzi skupinami, len v prípade dysplastického névu sme pozorovali vzostup, ktorý bol v porovnaní s benígnym komplexným névom na hranici signifikantnosti.



## Diskusia

Protinádorová imunita je veľmi dôležitá súčasť obranných schopností organizmu pri vznikajúcich nádoroch. Má viacero efektorových zložiek, kľúčovú úlohu zohráva špecifická bunková imunita.

Výsledky našej pilotnej štúdie poukazujú na vzostup infiltrácie tkaniva CD8+ cytotoxickými T-lymfocytmi vnútri aj v okolí melanocytových lézií, a to už v prípadoch dysplastického névu. Minimálna, prípadne žiadna infiltrácia nebola pozorovaná v okolí benígneho komplexného névu. Zaujímavé



zistenie je, že v prípadoch pokročilého nodulárneho melanómu pozorujeme nižšiu úroveň infiltrácie CD8+ cytotoxickými T-lymfocyty. Podobné, ale menej výrazné výsledky sme pozorovali aj v prípade CD56+ NK buniek, kde výsledky neboli štatisticky signifikantné.

Podľa Park et al.<sup>(5)</sup> je prítomnosť lymfocytov v malígnom melanóme priaznivý prognostický faktor, ale klinickopatologický význam intra- a peritumorálnych lymfocytov ostáva nejasný. Autori pozorovali, že vysoká infiltrácia lymfocyty, najmä peritumorálne, bola asociovaná s nižším gradom nádoru podľa Clarka a menšou hrúbkou podľa Breslawa. U týchto pacientov bolo tiež pozorované dlhšie prežívanie. V prípade analýzy subtypov melanómu neboli dokázané žiadne signifikantné rozdiely. To je v súlade aj s našimi pozorovaniami.

Naopak, v štúdií Rahbar et al.<sup>(6)</sup> sa u pacientov s primárnou formou kožného melanómu ukázala pozitívna korelácia medzi hrúbkou a štádiom nádoru a infiltráciou cytotoxickými T-lymfocyty. Autori však nehodnotili samostatne rôzne histologické typy malígnych melanómov so zameraním na progresiu choroby. Skúmanie prítomnosti lymfocytov a prognózy pacienta doposiaľ neprineslo jednoznačné závery o klinickom význame tohto hodnotenia. Predpokladá sa však, že imunitný systém je zodpovedný za inhibíciu vzniku vzdialených metastáz, deštrukciu nádorových buniek a môže byť zodpovedný za spontánnu regresiu malígneho melanómu. Viacerí autori opísali, že malígny melanóm bez dôkazu primárneho origa má lepšiu prognózu a menej agresívny priebeh ako porovnateľný nádor, kde je primárne ložisko dokázateľné. Za tento paradox je pravdepodobne zodpovedná práve aktivácia imunitného systému<sup>(7,8)</sup>.

Malígny melanóm je vysokoimunogénny tumor, je charakteristický vysokou bunkovou variabilitou v dôsledku akumulácie početných mutácií vedúcich k výraznej heterogenite tumoru. Práve akumulácia početných mutácií vedie k tvorbe nádorových neoantigénov aktivujúcich imunitný systém. Bunky imunitného systému vo veľkej miere reagujú na prítomnosť nádorových antigénov, o čom svedčí prítomnosť týchto buniek v nádore a jeho okolí. Nádor má mechanizmy, ktorými môže ovplyvniť aktiváciu imunitného systému<sup>(9)</sup>. To môže viesť k nekontrolovanej proliferácii buniek.

Ukazuje sa, že imunitná odpoveď zohráva dôležitú úlohu v procese vzniku a progresie malígneho melanómu. Jednou z možností terapie melanómu je práve ovplyvnenie imunitnej odpovede. Táto terapia v súčasnosti znamená výrazný pokrok v terapii metastázujúceho malígneho melanómu. Výsledky našej pilotnej štúdie naznačujú, že pri progresii malígneho melanómu dochádza k útlmu protinádorovej imunitnej odpovede. Nižšiu infiltráciu tkaniva cytotoxickými T-lymfocyty intratumorálne sme pozorovali vo všetkých prípadoch pokročilého nodulárneho malígneho melanómu. Práve pochopenie princípov regulácie imunitnej odpovede vo vzťahu k štádiu choroby bude mať veľký význam pre využitie týchto poznatkov v terapii pacientov v budúcnosti.

**Podakovanie:** Tento článok vznikol vďaka podpore v rámci OP Výskum a vývoj pre projekt: Dobudovanie multidisciplinárneho centra pre biomedicínsky výskum – BIOMEDIRES, ITMS 26210120041, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

### LITERATÚRA

1. Janega P, Szemes T, Minarik G. Malígny melanóm – nové aspekty výskumu *NewsLab* 2017; 8(1): 44-47.
2. Zeuthen J, Dzhandzhugazyan K, Hansen MR, et al. The immunogenic properties of human melanomas and melanoma-associated antigens recognized by cytotoxic T lymphocytes. *Bratisl Lek Listy* 1998; 99(8-9): 426-434.
3. Jacquelot N, Roberti MP, Enot DP, et al. Predictors of responses to immune checkpoint blockade in advanced melanoma. *Nature Communications* 2017; 8(1): 592.
4. Ridolfi L, de Rosa F, Fiammenghi L, et al. Complementary vaccination protocol with dendritic cells pulsed with autologous tumour lysate in patients with resected stage III or IV melanoma: protocol for a phase II randomised trial (ACDC Adjuvant Trial). *BMJ Open* 2018; 8(8): e021701.
5. Park CK, Kim SK. Clinicopathological significance of intratumoral and peritumoral lymphocytes and lymphocyte score based on the histologic subtypes of cutaneous melanoma. *Oncotarget* 2017; 8(9): 14759-14769.
6. Rahbar M, Naraghi ZS, Mardanpour M, et al. Tumor-Infiltrating CD8+ Lymphocytes Effect on Clinical Outcome of Muco-Cutaneous Melanoma. *Indian J Dermatol* 2015; 60(2): 212.
7. van der Ploeg AP, Haydu LE, Spillane AJ, et al. Melanoma patients with an unknown primary tumor site have a better outcome than those with a known primary following therapeutic lymph node dissection for macroscopic (clinically palpable) nodal disease. *Ann Surg Oncol* 2014; 21(9): 3108-3116.
8. Weide B, Faller C, Elsasser M, et al. Melanoma patients with unknown primary site or nodal recurrence after initial diagnosis have a favourable survival compared to those with synchronous lymph node metastasis and primary tumour. *PLoS One* 2013; 8(6): e66953.
9. Passarelli A, Mannavola F, Stucci LS, et al. Immune system and melanoma biology: a balance between immunosurveillance and immune escape. *Oncotarget* 2017; 8(62): 106132-106142.

Jana Lacová

Ústav patologickej anatómie, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave  
Sasinkova 4, 811 08 Bratislava  
e-mail: jana.lacova94@gmail.com